



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

Авторезиме на докторска дисертација

**Евалуација на антиоксидативни и цитотоксични особини на
капсаиноиди екстрахирани од лути пиперки култивирани во Република
Македонија**

м-р Викторија Максимова

Штип, 2016

**ЕВАЛУАЦИЈА НА АНТИОКСИДАТИВНИ И ЦИТОТОКСИЧНИ ОСОБИНИ НА
КАПСАИЦИНОИДИ ЕКСТРАХИРАНИ ОД ЛУТИ ПИПЕРКИ КУЛТИВИРАНИ ВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

АВТОРЕЗИМЕ НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Комисија за оценка и одбрана на докторска дисертација:

Комисија:

Претседател: Проф. д-р Рубин Гулабоски

Член: Проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска

Член: Проф. д-р Зорица Арсова Сарафиновска

Ментор: проф. д-р Лилјана Колева-Гудева

Екстерен ментор: проф. д-р Валентин Мирчески

Научна област: Физиологија на растенијата

ЕВАЛУАЦИЈА НА АНТИОКСИДАТИВНИ И ЦИТОТОКСИЧНИ ОСОБИНИ НА КАПСАИЦИНОИДИ ЕКСТРАХИРАНИ ОД ЛУТИ ПИПЕРКИ КУЛТИВИРАНИ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Краток извадок

Предностите на антиоксидантите од растително потекло кои се внесуваат во вид на прехранбени производи или медицински хербални препарати опишани во последните години беа поттик за одредување на антиоксидативните особини на пиперката, како една од најчесто култивираниите растенија во Република Македонија. Антиоксидантите се особено важни во процесот на неутрализација на слободните радикали, поврзани со серија на промени на клеточно ниво што може да доведат до канцерогени промени во клетката. Поради тоа целта на оваа студија беше да се направи анализа на антиоксидациските и цитотоксичните особини на капсаициноидот и екстрактите добиени од петнаесет различни генотипови на *Capsicum annuum* L., fam. Solanaceae.

Антиоксидацискиот капацитет на капсаициноидот и екстрактите од пиперка беше одреден преку две волтаметриски и една спектроскопска метода. Електрохемиската карактеризација на капсаициноидот и *Capsicum* екстрактите беше направена со помош на електрода од стаклест јаглерод и примена на циклична и квадратно-бранова волтаметрија.

Преку презентираниите резултати од оваа електрохемиска студија може да се предложи нов, едноставен и брз волтаметриски метод за директно одредување на антиоксидацискиот капацитет на овие компоненти, како и на голем број други хербални екстракти кои содржат исти или слични соединенија. Воедно со овој метод за прв пат беа испитани и редокс интеракциите помеѓу капсаициноидот и другите биоактивни компоненти во лутата пиперка, односно беше одреден нивниот синергистички антиоксидациски ефект. Снимените волтамограми укажуваат на тоа дека лесно е возможна редокс комуникацијата помеѓу овие компоненти, односно помеѓу нив постои сигнификантен синергистички антиоксидациски ефект.

Цитотоксичното дејство на капсаициноидот и екстрактите од пиперка беа испитани со две *in vitro* методи: MTT и LDH тестови врз клетките изолирани од

неуробластома туморно ткиво. Резултатите од овие испитувања покажаа дека капсаициноот поседува дозно и временски зависни цитотоксични ефекти врз неуробластома клетките, но екстрактите од пиперка не поседуваат цитотоксичен ефект врз овој вид на клетки. Земајќи ја предвид прегледаната литература што ни посочува дека во механизмот на цитотоксичност на капсаициноот се вклучени и слободните радикали би можеле да заклучиме дека капсаициноот во комбинација со другите биоактивни компоненти присутни во плодот од пиперка поседува силен синергистички антиоксидациски ефект, преку кој тој придонесува за неутрализација на слободните радикали кои предизвикуваат апоптоза во канцер клетките. Од друга страна пак, капсаициноот би можел да спречи серија на дегенеративни заболувања во нормалните клетки.

Од резултатите од оваа студија може да заклучиме дека производството на лути пиперки во Република Македонија треба дополнително да се стимулира не само поради тоа што пиперката би можеле да ја сместиме во групата на функционална храна, туку воедно и бидејќи таа претставува единствен хербален материјал што служи како суровина за екстракција и изолација на капсаицин, кој во одредени концентрации може да поседува и цитотоксични особини. Како таков капсаициноот треба да помине голем број на предклинички и клинички испитувања за да може да биде вклучен во терапија на разни видови на канцер.

Клучни зборови: *Capsicum*, капсаицин, хроматографија, електрохемија, фармаколошка активност.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF CAPSAICINOIDS EXTRACTED FROM HOT PEPPERS CULTIVATED IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Abstract

Many advantages of plant-derived antioxidants, which have been consumed as food or herbal preparations were reported, recently. These data were a mainspring for this study to consider the determination of the antioxidant properties of hot peppers, as one of the most frequently cultivated plant in Republic of Macedonia. Antioxidants are particularly important for the process of neutralization of free radicals, related to the serial of changes in the cell membrane which could lead to cancerogenic changes in the cell. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidative and cytotoxic properties of capsaicin and extracts obtained from 15 different genotypes of *Capsicum annuum* L. fam. Solanaceae.

The redox features of capsaicin and *Capsicum* sp. fruit extracts (hot peppers extracts) have been studied at glassy carbon electrode by means of cyclic (CV) and square-wave voltammetry (SWV).

The results that were obtained in this electrochemical study could provide a new, simple and quick voltammetric method for estimation of the antioxidative capacity of these components, as well as a number of other herbal extracts that contain the same or similar compounds. This method also features, for the first time, with the redox interactions between capsaicin and other bioactive components in hot pepper, which later explains their synergistic antioxidative effect. Typical SW voltammograms that were recorded have shown that these compounds enter in redox cycle, or there is a significant synergistic effect between them.

The cytotoxic effect of capsaicin and ethanolic *Capsicum* extracts on B104 neuroblastoma cells were investigated by two spectroscopic methods: MTT and LDH assays in order to determine viability and cell death in B104 neuroblastoma cells. Results have shown that there was a significant cytotoxicity of capsaicin (100 $\mu\text{mol/l}$) after 24 h incubation and for capsaicin (250 $\mu\text{mol/l}$), even when cells are

treated for 1 h. On the other hand, ethanolic *Capsicum* extracts did not show any cytotoxic effect.

Considering the reviewed literature which indicates that the mechanism of cytotoxicity of capsaicin includes free radicals, we could conclude that capsaicin combined with other bioactive components (present in the fruit of the pepper) possess strong synergistic antioxidant effect and through this effect, it can contribute to neutralization of the free radicals which cause apoptosis in cancer cells.

On the other hand, it could prevent a series of degenerative diseases in normal cells. Based on the results of this study we can conclude that the cultivation of hot peppers in our country should be seriously stimulated not only because the pepper could be established in the group of functional foods, but at the same time because it is the only herbal material that can serve as raw material for extraction and isolation of capsaicin which in certain concentrations can possess cytotoxic properties. In this way, capsaicin should pass a number of pre-clinical and clinical trials before it is involved in the treatment of various types of cancer.

Key words: *Capsicum*, capsaicin, chromatography, electrochemistry, pharmacological activity.

1. ВОВЕД

Капсаициот претставува главен претставник од групата на протоалкалоиди, капсаициноиди. Формирањето на капсаициноидите е специфична особина карактеристична само за секундарниот метаболизам на растенијата од родот *Capsicum*. Лутите пиперки се карактеризираат со присуството на ванилил конјугати од амиден тип, отсутни или заменети од страна на нивните не лутни естри, изостери (капсиноиди) кај благите видови на пиперки (Kobata et al., 1998). Пиперката, *Capsicum annuum* L., fam. Solanace, по своето стопанско значење е една од водечките градинарски култури во Република Македонија. Таа се одгледува најмногу заради плодовите, кои се користат во исхраната преку целата година, во нивната ботаничка или технолошка зрелост (Јанкуловски, 1997).

Поради лутниот вкус и иритирачкиот ефект на капсаициот, тој бил предмет на истражување уште многу одамна. Лутината или „топлината“ што капсаициот ја предизвикува кога ќе се внесе *per os*, или при топикална апликација се изразува во Scoville топлински единици (Scoville Heat Unit, SHU), според мерната скала која за прв пат ја поставил американскиот фармацевт Wilbur Scoville. SHU е вредност која дава информација за тоа колку пати екстрактот од пиперка треба да се разреда во вода за да ја изгуби лутината, односно таа органолептички да не се почувствува. Чистиот капсаицин има лутина која се мери како 16 000 000 SHU.

Лутниот вкус, односно чувството на топлина кое го забележуваме кога капсаициот доаѓа во контакт со оралната слузница се должи на брзата дифузија на капсаициот преку епителните клетки на мукозната мембрана (заради големата липофилност на капсаициот) и неговото поврзување со TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1) рецепторите сместени во периферните сензорни неврони за топлина и болка. Овие рецептори претставуваат неспецифични Ca^{2+} канали што се отвораат при поврзување со капсаицин (Caterina и Julius, 2001). Иницијалниот инфлукс на калциум може да води до ослободување на неуротрансмитери и чувство на топлина, при аплицирани мали концентрации на капсаицин, или чувство на печење при големи концентрации на капсаицин (Iwai et al., 2003; Ludy et al., 2012).

Капсаициноот присутен во плодот од пиперка е пред сè одговорен за аналгетскиот ефект на екстрактот од пиперка. Capsicum фластерите и различни видови на масти или други фармацевтски облици се искористени за инкорпорирање на капсаициноот во нив. Тие се користат во терапија на болка најчесто предизвикана од артритис, невралгија, ишијалгија и друго слично потекло.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

При изработка на оваа докторска дисертација беше искористена литература од голем борј на домашни и странски автори, која се однесува на хемиските и фармаколошките особини на капсаициноот. Разгледувајќи ги првите научни трудови за откривањето на капсаициноот од Micko et al. (1898), како и карактеризацијата на неговата структура и номенклатура Nelson, (1910), па се до поновата литература во која се предложени најнови методи за негова екстракција и квантификација Речиска и Materska, (2007), беше согледано дека содржината на капсаицин во различни генотипови може да варира во зависност од повеќе фактори. Во ова истражување се задржавме на 15 генотипови кои се карактеристични за поднебјето на Република Македонија. Најголем дел од литературата која беше прегледана се однесува на антиоксидациските особини на капсаициноидите и методите за нивно одредување. Истите досега се малку испитувани со помош на електрохемиските особини, поради што во оваа докторска дисертација обрнавме внимание на развој на нов, брз и едноставен волтаметриски метод за определување на антиоксидацискиот капацитет на екстрактот од пиперка. Литературата која се однесува на цитотоксичниот ефект на капсаициноот објаснува најразлични механизми на делување на капсаициноот. Притоа, мал е бројот на референци кои го покажуваат конкретниот ефект на капсаициноот или екстрактите од пиперка врз неуробластома клетките. Токму затоа во оваа дисертација беше испитан цитотоксичниот ефект на капсаициноот но истовремено и на екстрактот од лута пиперка врз клеточна линија од неуробластома.

3. ЦЕЛИ И ПРЕДМЕТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Предмет на ова истражување беа петнаесет различни генотипови од лутата пиперка култивирана на поднебјето на Република Македонија. Најчесто застапени антиоксиданти во лутата пиперка се: витамин С, витамин Е, каротеноиди, кверцетин, лутеолин и капсаицин. Содржината на капсаицин во лутата пиперка е еден од главните параметри што е испитуван во ова истражување, бидејќи како резултат на присуството на капсаицин, пиперката може да биде искористена како во прехранбени така и во медицински цели.

Почетните истражувања од оваа докторска дисертација водат кон утврдување на соодветен метод и услови за екстракција на капсаицин од плодот од лутата пиперка, како и одредување на содржината на капсаициноиди во сите лути генотипови на видот *Capsicum annuum* L., култивирани во Република Македонија.

Основна цел на оваа докторска дисертација е да се воспостави нов и едноставен метод, со што лесно и брзо може да се испита антиоксидацискиот капацитет на капсаициноидот, со користење на циклична и квадратно-бранова волтаметрија и примена на електрода од стаклест јаглерод (Glassy Carbon Electrode, GCE). Преку овие електрохемиски истражувања се опишува и електродниот механизам на редокс реакцијата на капсаициноидот во средина со рН вредност блиска до физиолошката. Истовремено, оваа метода може да послужи и за испитување на интеракциите на капсаицин со некои од другите компоненти присутни во екстрактот од пиперка, односно неговиот синергистички ефект врз антиоксидативниот потенцијал на другите биоактивни компоненти во пиперката.

Дополнително, една од целите на оваа докторска дисертација, е да се испита цитотоксичноста на капсаициноидот и етанолните екстракти од пиперка врз B104 неуробластома клетките. Неуробластома претставува екстракранијален тумор што често се јавува кај детската популација со степен на преживување до 5 години. Со оглед на тоа дека во механизмот одговорен за цитотоксичното дејство на капсаицин во неуробластома клетките се вклучени и слободните радикали, крајната цел на нашата студија беше да се одреди каква е

корелацијата помеѓу антиоксидациското и цитотоксичното дејство на капсаицинот како главна биоактивна компонента во лутата пиперка.

Преку исполнување на дадените цели во оваа дисертација беше даден акцент на позитивните ефекти од пиперката во секојдневната исхрана, при што мора да се обрне внимание на генотиповите што се внесуваат. Од друга страна пак, мора да се истакне можноста за екстракција и изолација на капсаицинот како биоактивна молекула од оваа култура и негово понатамошно искористување во медицински цели.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1 Материјали

4.1.1 Растителен материјал

Плодовите од петнаесет генотипови од *Capsicum annuum*, култивирани во Република Македонија беа колекционирани кон крајот на август во фенолошка фаза на ботаничка зрелост. Истите беа култивирани и одгледувани на локации во Штип (41,746° N, 22,199° E) и Струмица (41,437° N, 22,643° E) во текот на 2012 и 2013 година.

Ред.бр.	Генотип (народно име)	лутина
1.	везена долга	лута
2.	феферона	лута
3.	бомбона	лута
4.	златен медал	блага
5.	фортенсе	лута
6.	џинки	лута
7.	сиврија	лута
8.	куртовска капија	блага
9.	пиран	лута
10.	везена куса	лута
11.	гамби	лута
12.	aisef F1	лута
13.	хибрид 13514	лута
14.	хибрид 14530	лута
15.	хибрид 13515	лута

4.1.2 Клеточни линии

За испитување на цитотоксичноста на капсаицин врз канцер клетки беше искористена B104 неуробластома клеточна линија, ATCC, Manassas, VA,

(Schubert et al., 1974). Овие клетки се изолирани од туморно неуробластома ткиво кај стаорец. Клетките беа култивирани во стерилни услови во DMEM/Ham's подлога збогатена со L-Glutamine (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), што содржеше и 15% FBS (Fetal Bovine Serum) и 1% раствор од антибиотик пеницилин/стрептомицин, со концентрација во подлогата од 1%. Медиумот за култивација беше менуван на секои 2-3 дена, а потоа клетките беа инкубирани во инкубатор на 37 °C, во атмосфера со регулирана влажност и 5% CO₂. Дваесет и четири часа пред нивниот третман клетките беа изброени и клеточната суспензија беше распределена по 2×10⁴ клетки/бунарче. На овој начин клетките беа оставени да се адхерираат на површината на сидовите на бунарчињата.

4.2 Методи

4.2.1 Методи за екстракција

Првиот експериментален чекор којшто е неопходен за понатамошно испитување на капсаициноидите е нивната екстракција од пиперката со соодветен растворувач. Врз основа на нивната растворливост, во минатото се користени различни растворувачи за екстракција на капсаициноидите како што се: метанол, етанол, изопропанол, ацетон и етил етер, хлороформ, метилен хлорид, етилацетат и воден раствор на натриум хидроксид (Wagner et al., 2011). Како еден од најнетоксичните од овие поларни растворувачи во оваа студија беше одбран етанолот, како ефикасно екстрактивно средство, со најмалку несакани или токсични ефекти врз човечкиот организам. Многу студии ја испитувале ефикасноста на различни методи за екстракција и потврдиле дека ефикасноста на екстракцијата со конвенционалните методи (мацерација, перколација, Soxlet-екстракција) и поновите методи (ултразвучна, микробранова екстракција и екстракција со суперкритични флуиди) е слична (Collins et al., 1995; Goci et al., 2013).

Во ова истражување беа искористени две конвенционални методи како начини за екстракција на капсаициноидите и тоа **мацерација со вакуум филтрација** и **Soxlet екстракција**.

4.2.2 Метод за квантитативно определување на капсаициноиди, високопритисочна течна хроматографија (High Pressure Liquid Chromatography, (HPLC))

Врз основа на повеќе автори кои претходно ги испитувале капсаициноидите во разни видови на пиперки и нивните добиени резултати во кои е постигнато ефикасно раздвојување со употреба на C18 колоната, во нашите истражувања исто така беше искористен овој тип на колона (Othman et al., 2011, Perucka and Oleszek, 2000).

Апаратура: хроматографските анализи од ова истражување беа спроведени со помош на Agilent 1200 хроматографски систем, (Agilent Technologies Palo Alto, CA, USA), составен од: бинарна пумпа (Model Agilent 1100 series Pump), автосемплер (Model Agilent 1100 series G-1329 ALS), , DAD детектор (Model Agilent series G-13158 Diode Array Detector), поврзан со Agilent ChemStation софтвер.

Хроматографски услови:

Колона:	Zorbax SB-C18 колона (4,6 × 250 mm × 5 μm)
Мобилна фаза:	50% ацетонитрил : 50 % вода (V/V)
Брзина на проток:	1,5 mL / min.
Температура на колоната:	25 °C
Детекција:	
Diode array детектор (DAD):	UV, 220 nm
Волумен на инјектирање:	10 μL

4.2.3 Методи за одредување на антиоксидативен капацитет

4.2.3.1 Волтамметриски методи: Циклична и Квадратно-бранова волтамметрија

Апаратура: за електрохемиските анализи на стандарните раствори и екстрактите беше користен Palm Sense потенциостат (PalmSens BV, Houten, Netherlands) поврзан со PS Trace system, version 3.0., програма за прикажување и обработка на резултатите. Мерењата беа изведени во електрохемиска ќелија со волумен од 5 mL, во која беа вронети трите електроди. Електродата од стаклест јаглерод (glassy carbon electrode, (GCE)), беше искористена како

работна електрода (со дијаметар од 1,5 mm), како референтната електрода беше користена Ag/AgCl (KCl 3 mol/L) и Pt жица како помошната електрода.

Работни услови: Експериментите изведени со **CV** беа спроведени во опсег на потенцијалот од -0,200 до 1,000 V, со брзина на скенирање $\nu = 10 \text{ mV/s}$ (ако не е поинаку нагласено). Експерименталните услови при работа со **SWV** беа: потенцијален чекор $dE = 0,001 \text{ V}$, амплитуда $E_{sw} = 0,050 \text{ V}$ и фреквенција $f = 10 \text{ Hz}$.

Постапка: Пред секоја електрохемиска анализа површината на работната електрода беше промиена со етанол, дестилирана вода и полирана со AlCl_3 , проследено со повторно промивање со етанол, редестилирана вода и оставена да се исуши на воздух.

Првиот дел од електрохемиските експерименти се однесува на електрохемиска карактеризација на капсаицинот во различни медиуми и при различна pH вредност.

Вториот дел од оваа електрохемиска студија се однесува на одредување на синергистичките антиоксидативни капацитети на капсаицинот и другите биоактивни компоненти најчесто застапени во пиперката, додавани во вид на чисти изолирани стандардни супстанции (витамин E, аскорбинска киселина, кверцетин). По основната електрохемиска карактеризација на овие компоненти, кон секоја од испитуваните супстанции ($c = 10 \text{ } \mu\text{mol/L}$), беше додаван капсаицин со постепено зголемување на неговата концентрација 10-100 $\mu\text{mol/L}$ и беа снимени SW волтаммограми.

Третиот дел од оваа студија се однесува на директно мерење на антиоксидативниот капацитет на етанолните екстракти добиени од различни генотипови на пиперки.

4.2.3.2 FRAP метода за одредување на антиоксидациски капацитет

FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power, железо редуцирачки антиоксидациски капацитетен) метод претставува *in vitro* тест кој за првпат бил опишан од страна на Benzie и Strain, (1996) и служи за одредување на антиоксидативниот капацитет на супстанциите. Овој метод се заснова на способноста на антиоксидантите за редукција на тровалентното во двовалентно железо. При

ниска pH вредност, Fe (III) кое е вградено во комплекс со реагенсот (Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-три(2-пиридил)-1,3,5-триазин)) се редуцира до двовалентно железо (Fe^{2+}), кое е обоено интензивно темно сино со максимална апсорбанца на 593 nm.

Апаратура: ELISA читач на плочи, (Accu Reader, Metertech, Taipei, Taiwan) со UV/VIS детектор.

Постапка: За FRAP анализата беа земени по 30 μL од секој примерок и пренесени во бунарчињата на микроплочата. Апсорбанцата беше одредувана со помош на UV/VIS детектор, на бранова должина од 593 nm. Антиоксидациската способност на испитуваната супстанца беше одредена преку конструирање на калибрациона крива добиена за измерените стандардни раствори на FeSO_4 , со концентрација од 100-500 $\mu\text{mol/L}$. Поради тоа резултатите се изразуваат како Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$. Како позитивна контрола беше користен стандарден раствор на аскорбинска киселина во серија од неколку разредувања ($c = 0,015$ до $0,350 \text{ mmol/L}$).

4.2.4 Методи за одредување на цитотоксичност

Вијабилноста на клетките по третман со одредена испитувана супстанца може да се одредува со помош на повеќе *in vitro* методи. Во оваа студија вијабилноста на B104 неуробластома клетките по третман со капсаицин или екстракти од лута пиперка беше одредувана со помош на MTT методот. За одредување на процентот на смрт на клетките односно појавата на апоптоза беше искористен LDH методот.

4.2.4.1 MTT метод

Овој метод се заснова на конверзија на хидросолубилниот реагенс MTT [(3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид] во нерастворлив формазан под дејство на целуларната редуктаза која ја има нормално во клетките. Со руптура на клеточната мембрана овој интрацелуларен ензим излегува надвор од клетката и го претвора MTT во нерастворлив формазан. На крајот формазанот се раствора и се следи абсорбанцата на растворот во бунарчињата во кои биле инкубирани клетките со испитуваната супстанца.

Апартура: читач на плочи (Antho 2010), на бранова должина од 570 nm и референтна бранова должина од 630 nm.

Постапка: MTT анализата беше изведена според дадениот протокол од Roche Diagnostics GmbH за Cell Proliferation Kit I.

4.2.4.2 LDH метод

LDH методот претставува едноставен *in vitro* метод за одредување на оштетувањата на клеточната мембрана. Овој метод се базира на ослободувањето на лактат дехидрогеназа (LDH), стабилен цитоплазматски ензим присутен во многу клетки, надвор од клетката при руптура на клеточната мембрана (Chou et al., 2009).

Апартура: читач на плочи (Antho 2010), на бранова должина од 492 nm.

Постапка: Анализата беше спроведена според протоколот од производителот за LDH китот (Roche Diagnostics GmbH).

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во ова поглавје беа опфатени резултатите добиени од експерименталните истражувања во рамките на оваа докторска дисертација.

5.1 Морфолошките карактеристики на различните генотипови на пиперки

Морфолошките карактеристики (висина на стебло, должина на интернодии, дебелина на стебло, број на листови, должина на лист, ширина на лист, број на соцветија, број на цветови по цветна китка) на растението *Capsicum annuum* L., на петнаесетте испитувани генотипови на пиперки, како и морфолошките карактеристики на плодот (број на плодови по растение, боја на плодот, должина, ширина на плодот, маса на плодот, број на комори) беа најпрво презентирани во резултатите. Добиените вредности беа претставени средна вредност од 10 поединечни мерења на растението и плодовите во фенолошка фаза на ботаничка зрелост.

Резултатите од овие мерења што се однесуваат на морфолошките карактеристики на петнаесетте различни генотипови од видот *Capsicum annuum* L., испитани во нашите експерименти, покажуваат дека неколку

генотипови значително се разликуваат од генотиповите на куртовска капија и златен медал, земени како благи пиперки (контроли) во овие експерименти. Растенијата од генотиповите феферона и џинки се покажале како пиперки со најнизок раст, што не надминува висина од 40 cm, потоа следуваат везена куса и бомбона, кои влегуваат во групата на средно високи пиперки, според Јанкуловски (1983) и Попов (1940), додека генотиповите гамби и пиран влегуваат во групата високи пиперки. Сите останати генотипови што беа испитувани спаѓаат во групата на многу високи, со висина над 90 cm. Притоа, може да се забележи дека генотиповите со низок и средно висок раст имаат и најмали плодови со должина од околу 2 до 6 cm и маса од 2 до 6 g. Колева Гудева и сор., (2013) покажале дека создавањето на капсаицинот како секундарен метаболит во растението има инхибиторна активност врз андрогенезата на пиперката. Ова значи дека генотиповите со најнизок раст и најмали плодови, би имале највисока содржина на капсаицин. Ова го потврдија и нашите резултати презентирани подолу во резултатите добиени од хроматографија.

5.2 Хроматографското определување на содржината на капсаициноиди

Квантитативното определување на капсаициноидите беше направено со употреба на реверзнофазна високо ефикасна течна хроматографија според валидиран метод опишан од Othman et al., (2011). UV спектрите на капсаицин и дихидрокапсаицин, во опсег на бранова должина од 200 до 400 nm, беа снимени со детектор со низа од диоди (DAD, Diode Array Detector) при што на нив се забележуваат два пика карактеристични и за капсаицинот и за дихидрокапсаицинот, на 228 и 280 nm. Брановата должина од 228 nm на која беше измерен апсорбционен максимум за капсаицин и дихидрокапсаицин, беше одбрана за определување на овие две соединенија во нивните стандардни раствори, како и во екстрактите добиени од различните генотипови на лути пиперки.

Типичниот хроматограм на стандарден раствор на капсаицин и дихидрокапсаицин (и двете соединенија присутни во концентрација од 10 µg/mL) покажа дека времето потребно за елуирање на капсаицинот е 7,65 минути, додека за дихидрокапсаицинот е 10,82 минути. Идентификацијата на

капсаицин и дихидрокапсаицин во екстрактите беше направена врз основа на споредба на ретенционите времиња на пиковите од екстрактите со пиковите од стандардниот раствор.

Добиените резултатите кои се однесуваат на валидацијата на методот за квантитативно определување на капсаициноиди укажуваат на тоа дека овој метод се карактеризира со задоволителна точност и прецизност. Добиените вредности од испитувањето на рипитабилноста на методот укажуваат дека методот е прецизен ($RSD \leq 2,0 \%$), односно соодветен за определување на содржината на капсаицин и дихидрокапсаицин во екстрактите од лути пиперки. Високите вредности за аналитичкиот принос ($98,88 \pm 2,87 \%$ за капсаицин и $98,62 \pm 2,46 \%$ за дихидрокапсаицин) укажуваат на висока точност на методот.

Вредноста на коефициентот на корелација ($R^2 = 0,999$) укажува на висок степен на линеарност во испитуваното концентрациско подрачје. Истовремено, линеарноста на предложениот метод беше докажана во широк концентрациски опсег од 1,52 до 380 $\mu\text{g/mL}$ за капсаицин и од 1,116 до 279 $\mu\text{g/mL}$ за дихидрокапсаицин.

Добиените резултати за содржина на капсаициноиди во испитуваните екстракти добиени со мацерација покажаа дека содржината на капсаицин се движи во границите од 0,080 до 2,800 mg/g сува маса на пиперка, што одговара на пропишаната содржина во литература (Othman et al., 2011, Gnayfeed et al., 2001). Генотипот фефрона поседува највисока содржина на капсаицин, $2708,091 \pm 48,75 \mu\text{g/g}$ сува маса. По него следуваат генотиповите џинки и бомбона со $1725,625 \pm 31,06$ и $1040,431 \pm 18,73 \mu\text{g/g}$ сува маса, соодветно. Најниска содржина на капсаицин беше измерена кај генотипот гамби, $8,700 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ сува маса, додека кај генотиповите кои не се лути и беа искористени како контроли (златен медал и куротвска капија), капсаициноидот не беше детектиран.

Од резултатите добиени за етанолните екстракти добиени со Soxlet екстракција може да се забележи дека капсаициноидот е застапен со највисока концентрација повторно во екстрактот добиен од генотипот фефрона ($2835,190 \pm 51,03 \mu\text{g/g}$ сува маса), додека по него следуваат екстрактот од бомбона и џинки со

концентрација на капсаицин $2437,991 \pm 43,88 \mu\text{g/g}$ сува маса и $2048,533 \pm 36,87 \mu\text{g/g}$ сува маса, соодветно. Соодносот на капсаиноидите во екстрактите добиени со Soxhlet методот беше сличен како и кај екстрактите добиени со мацерација. Во екстрактот од везена лута капсаицинот е застапен со 42,80%, а дихидрокапсаицинот 45,99%; кај екстрактот од цинки процентуалната застапеност е 31,44 и 45,41%, за капсаицин и дихидрокапсаицин, соодветно, а кај екстрактот од везена куса капсаицинот е застапен со 28,85% а дихидрокапсаицинот со 48,82%.

Дадените резултати за квантитативната содржина на капсаиноидите во екстрактите од лути пиперки даваат добра основа за понатамошно испитување на биолошките/фармаколошките особини на капсаицинот како и на екстрактите од пиперка.

5.3 Резултати и дискусија на електрохемиските анализи на антиоксидативниот капацитет на капсаицин и *Capsicum* екстрактите

5.3.1 Карактеризација на електрохемиските особини на капсаицин со примена на циклична волтаметрија

Почетните електрохемиски експерименти беа направени со цел да се добие претстава за ефектот на растворувачот врз волтаметриските особини на капсаицин и воедно да се испита хемиската стабилност на генерираните реактивни видови во системот. Оксидацијата на капсаицин во воден раствор од KCl беше забележана при потенцијал околу 0,600 V, додека во етанолно-водениот раствор на KCl беше забележано поместување на оксидациониот пик на капсаицин кон 0,700 V. Резултатите посочуваат дека најдобра средина за понатамошна анализа на капсаицинот е водената средина, при што капсаицинот најлесно се оксидира и се добива добро дефиниран волтамограм. Анодниот пик на капсаицин ($I_{p,a}$) во воден раствор на KCl, се јавува на потенцијал $E_{p,a} = 0,641 \text{ V}$, со јачина на струјата која се добива од $I_{p,a} = 0,388 \mu\text{A}$. При овие услови на волтамограмот на капсаицин се јавува и мал катоден пик ($I_{p,c}$), кој се забележува на потенцијал од $E_{p,c} = 0,052 \text{ V}$ со јачина на струја од $I_{p,c} = 0,067 \mu\text{A}$. Анодниот пик на капсаицин во 50% етанолен раствор

се појавува на потенцијал од $E_{p,a} = 0,661 \text{ V}$ и јачина на струја $I_{p,a} = 0,250 \text{ }\mu\text{A}$, додека соодветните вредности во 96% етанолен растовр се $E_{p,a} = 0,736 \text{ V}$ и $I_{p,a} = 0,271 \text{ }\mu\text{A}$.

Со цел да се испита влијанието на pH вредноста на средината во која се одвива електрохемиската реакција врз волтаметриското однесување на капсаицин, беа изведени неколку експерименти во пуфери со различна pH вредност. Ацетатниот (pH = 3,6 и 5,5), фосфатниот (pH = 6,6 до 7,8) и бикарбонатниот пуфер (pH = 9,4 и 10,6), сите со концентрација $c = 0,100 \text{ mol/L}$, беа искористени во оваа анализа како медиум во кој се одвива реакцијата помеѓу капсаициот и површината на GCE. Притоа, во сите мерења кон нив беше додаден KCl ($c = 0,010 \text{ mol/L}$), како електролит.

Во киселиот ацетатен пуфер при pH = 3,6 капсаициот пројавува оксидациски пик на потенцијал од околу 0,613 V, додека во алкален раствор (pH = 10,6) оксидацискиот пик е поместен на потенцијал од 0,259. Во неутрална средина, при pH = 7,1 оксидацијата на капсаициот се јавува при потенцијал од 0,417 V. Поместувањето на оксидацискиот потенцијал на капсаициот кон пониски вредности при зголемување на pH вредноста на средината значи дека протоните се вклучени во електродната реакција. Ова укажува на тоа дека оксидацијата на капсаицин најверојатно е проследена со депротонизација. Притоа, знаејќи дека процесот на депротонизација полесно се одвива во базна средина (бидејќи концентрацијата на H^+ јони тука е помала), оправдано е што капсаициот во базна средина се оксидира на пониски потенцијали.

Карактеризација на електродната реакција на капсаицин

За да се направи подетален преглед на електрохемиското однесување на капсаицин најпрво беше направена карактеризација на електродната реакција на капсаицин во неутрална средина, pH = 7,1. Ова беше направено со примена на циклична волтаметрија и аплицирање на потенцијал во интервалот од -0,200 до 1,000 V. На слика 5.14. е прикажан цикличен волтамограм на капсаицин со концентрација, $c = 50 \text{ }\mu\text{mol/L}$ во пуферски раствор (pH = 7,1) и 0,010 mol/L KCl како основен електролит, со брзина на промена на потенцијалот, $\nu = 10 \text{ mV/s}$. Електрохемиската реакција се случува на

површината на работната електрода од стаклест јаглерод и со промена на потенцијалот од понегативни кон попозитивни вредности капсаицинонот се оксидира. Од хемиска гледна точка оксидацијата на капсаицинонот е реверзибилна, но поради спората реакција на редукцијата се смета дека оваа реакција е електрохемиски квазиреверзибилен процес. Од прикажаните волтамограми може да се воочи дека капсаицинонот директно реагира со површината на работната електрода, без присуство на медијатор. Оттука, може да кажеме дека ова истражување се однесува на директно определување и споредба на антиоксидативниот потенцијал на капсаицинонот, како и на етанолните екстракти од пиперка, со додавање на одреден волумен од стандардниот раствор на капсаицин или екстрактите од пиперки кон електрорхемиската ќелија која содржи само пуферски раствор и KCl.

Оксидацијата на капсаицин беше испитувана при различни брзини на промена на потенцијалот почнувајќи од 10 до 100 mV/s, со постепено зголемување за инкремент од 10 mV/s. Од снимените цикличните волтамограми добиени при зголемување на брзината на промена на потенцијалот може да се констатира дека системот е стабилен и јасно се воочува процесот на оксидација на капсаицинонот. Графичката зависност на интензитетот на анодната пик струја добиена при оксидација на капсаицинонот ($I_{p,a}$) и квадратниот корен од брзината на промена на потенцијалот (v), покажуваат линеарна зависност $y = 0,150 x - 0,322$, $R^2 = 0,999$. Оваа линеарната зависност ни дава информација дека овој процес е дифузииски контролиран, односно трансферот на капсаицин од растворот кон работната електрода воглавно е контролиран од процесот на дифузија.

Механизам на оксидација на капсаицин

Со цел за подетално испитување на механизмот на оксидација на капсаицин, беа снимени циклични волтаммограми на капсаицин со повторување на три циклуси на оксидација, односно редукција во еден експеримент. Волтаммограмите од првите два циклуси добиени со оксидација на капсаицин со концентрација 50 $\mu\text{mol/L}$, фосфатен пуфер со $\text{pH} = 6,5$ се дадени на слика 5.3.6. На првиот волтаммограм, добиен при првиот скен можат да се забележат

еден аноден (I_{a1} ; $E_{p,a1} = 0,44 \text{ V}$) и еден катоден пик (I_c , $E_{p,c} = 0,16 \text{ V}$). При вториот скен во истиот опсег на потенцијал, беше забележан и нов оксидациски пик (I_{a2} , $E_{p,a2} = 0,23 \text{ V}$). Новиот оксидациски пик I_{a2} , беше формиран при понизок потенцијал отколку првиот аноден пик. При промена на насоката на потенцијалот во вториот скен не беше забележан нов редукциски пик и висината на редукцискиот пик I_c , остана скоро иста. При разработка на волтаммограмите може да се забележи дека појавата на вториот оксидациски пик I_{a2} , се должи на редукцискиот продукт кој е претходно формиран како резултат на појавата на редукцискиот процес во I_c . Ова покажува дека редокс реакцијата која одговара на I_{a2}/I_c редокс пиковите се должи на единечен редокс пар кој се формира во последователна хемиска реакција која се надоврзува на иницијалната оксидација на капсаицин во пикот I_{a1} . Оваа претпоставка се докажува со волтаммограмите снимени во интервал на потенцијалот од $-0,2$ до $0,4 \text{ V}$. Притоа, очигледно е дека иницијалната оксидација на капсаицин која се случува при потенцијал од приближно $0,44 \text{ V}$ е неопходна реакција за појава на пик парот I_{a1}/I_c , кој понатаму претставува предуслов за да се забележи вториот оксидациски процес на капсаицин I_{a2} .

Според Yardim et al., (2013), се претпоставува дека капсаициноот најпрво подлегнува на иреверзибилна оксидација преку оддавање на два електрони, што води до добивање на феноксониум катјонски радикал. Овој радикал е подоцна нестабилен во растворот и брзо се конвертира во *o*-бензохинон преку нуклеофилен напад од H_2O . Покрај *o*-бензохиноноот при реакцијата на хидролиза се добива и метанол како спореден продукт.

На вториот волтаммограм (црвена боја) за капсаициноот се прикажува пик парот I_{a2}/I_c . Се претпоставува дека тој најверојатно одговара на *o*-хинон/катехол редокс парот на капсаицин, којшто може да биде формиран само после иницијалната оксидација на капсаицин проследена со хидролиза. Овие автори предложиле дека хидролитичката хемиска реакција може да се јави кога капсаициноот е растворен во кисела или базна средина до pH околу 9, бидејќи pK_a на *o*-метоксифенолот е 9,93 (Kachoosangi et al., 2008). Спротивно на нивната последната хипотеза, нашите резултати покажаа дека капсаициноот подлегнува на втора оксидација само во кисел или неутрален медиум. Притоа,

беше забележано дека катехолот кој се формира од капсаицинонот би можел да реагира со метанолот во близината на дифузионниот слој на работната електрода, при што се образува метоксифенол, кој ја претставува основната структура на капсаицинонот.

Кога истиот експеримент беше повторен во неутрална средина (фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,4$), вториот оксидационен пик кој се јави претходно, беше едвај забележлив. Додека, при $\text{pH} \geq 7,8$; цикличните волтаммограми на капсаицин воопшто не го прикажуваа новиот оксидационен пик при вториот циклус. При промена на насоката на потенцијалот кон понегативен бензохинонот се редуцира до *o*-хидроксифенолот (катехол), што резултира со редукционен пик I_c . Во вториот циклус, односно при вториот скен на потенцијалот во истиот опсег, катехолот се оксидира назад до *o*-бензохинон, што се забележува преку појавата на вториот аноден пик I_{a2} .

Карактеризација на електрохемиското однесување на ко-екстрахираните компоненти присутни во екстрактот од лута пиперка: витамин Е, аскорбинска киселина и кверцетин

По иницијалното проучување на основните електрохемиски особини на капсаицин и неговиот механизам на оксидација, неопходно беше да се проучат и волтаметриските особини на уште неколку биоактивни компоненти присутни во екстрактот од лута пиперка. Овие молекули, како што се: витамин Е, аскорбинска киселина и кверцетин, се многу често застапени во екстрактот во високи концентрации и можат да пројавуваат одредени синергистички/антагонистички ефекти со капсаицинонот. Основна електрохемиска карактеризација на овие компоненти беше спроведена со помош на циклична волтаметрија, додека нивниот синергистички антиоксидационен потенцијал беше одредуван преку користење на квадратно бранова волтаметрија.

Цикличниот волтаммограм на витамин Е, ($100 \mu\text{mol/L}$, во фосфатен пуфер при $\text{pH} = 7,1$), прикажан на слика 5.18 прикажува единечен иреверзибилен оксидационен пик кој се јавува на потенцијал од $E_{p,a} = 0,206 \text{ V}$ и јачина на струја на пикот $I_{p,a} = 1,032 \mu\text{A}$. Притоа, анодниот пик на витамин Е ($E_{p,a} = 0,206 \text{ V}$, $I_{p,a} = 1,032 \mu\text{A}$) е значително повисок од анодните пикови на другите компоненти

снимени при истите услови, што го оправдува неговото силно антиоксидативно дејство.

Од понатамошните експерименти со циклична волтаметрија беше добиен цикличниот волтамограм на кверцетин во фосфатен пуфер, pH = 7,1, при истите работни услови како и за витамин Е. Карактеризацијата на кверцетин беше направена преку испитување на неговата оксидација при различни брзини на промена на потенцијалот почнувајќи од 10 до 50 mV/s, со постепено зголемување за инкремент од 10 mV/s. Снимените циклични волтамограми добиени при зголемување на брзината на промена на потенцијалот, прикажуваат дека системот е стабилен и јасно се воочува процесот на оксидација на кверцетин.

На типичниот цикличен волтамограм од аскорбинска киселина со концентрација од 200 $\mu\text{mol/L}$, се воочува еден оксидациски процес на потенцијал од $E_{p,a} = 0,426 \text{ V}$ со јачина на струјата $I_{p,a} = 0,321 \mu\text{A}$. Оксидацијата на аскорбинска киселина беше испитувана при различни брзини на промена на потенцијалот почнувајќи од 10 до 50 mV/s, со постепено зголемување за инкремент од 10 mV/s. Притоа беше добиено линеарно зголемување на јачината на анодната пик струја при зголемување на брзината на промена на потенцијалот.

5.3.2 Резултати и дискусија на антиоксидацискиот капацитет на капсаицин и *Capsicum* екстрактите определувани со квадратно-бранова волтаметрија

Кога овие биоактивни компоненти се присутни во смеша со капсаицинонот (како што се присутни и во екстрактот од лута пиперка), лесно е возможна редокс комуникацијата помеѓу овие компоненти. Поради тоа беше испитан синергистичкиот антиоксидациски ефект на овие компоненти во смеша.

Со цел да се испита вкупниот антиоксидациски капацитет на сите овие компоненти во смеша со капсаицинонот, електрохемиските особини на нивните стандардни раствори поединечно или во комбинација, беа анализирани со примена на SWV, како една од најнапредните и најосетливите волтаметриски техники. Карактеристичните нето (вкупни) квадратно-бранови волтамограми

на витамин Е, кверцетин и аскорбинска киселина (при еквимоларни концентрации, 10 $\mu\text{mol/L}$) беа снимени на GCE во пуферски раствор при pH = 7,0.

Преку следење на SW волтаммограми што го прикажуваат волтамметрискиот одговор на витаминот Е и капсаицинонот, кога се присутни заедно во растворот во ќелијата, беше одредуван синергистичкиот антиоксидациски ефект на капсаицин и витамин Е.

Особено е интересно да се истакнат резултатите од ова истражување се однесуваат на интеракциите помеѓу капсаицинонот и останатите ко-екстрахирани компоненти присутни во екстрактот од лута пиперка. Притоа, со додавање на капсаицин кон витамин Е во еквимоларни концентрации во електролитниот раствор (10 $\mu\text{mol/L}$), сумарната пик струја на витамин Е беше заслабната од 1,615 до 1,182 μA , дополнително беше забележан уште еден мал пик на потенцијал од $E_{p,\text{net}} = 0,327\text{ V}$ и јачина на струја $I_{p,\text{net}} = 0,106\text{ }\mu\text{A}$, кој одговара на капсаицин. Овој феномен на намалување на $I_{p,\text{net}}$ на нето пикот за витамин Е при додавање на иста концентрација на капсаицин најверојатно се должи на адсорбцијата и делумното блокирање на површината на работната електрода од страна на капсаицинонот. Од друга страна, кога капсаицинонот беше додаден во значително повисока концентрација (50 $\mu\text{mol/L}$) од витамин Е, во ќелијата, јачината на нето струјата на витамин Е значително порасна од 1,615 до 2,021 μA .

Ефектот на капсаицин врз волтамметриските особини на кверцетин беше испитан на сличен начин како и кај витамин Е. Притоа, капсаицинонот и кверцетинот во еквимоларни концентрации во електролитниот раствор во ќелијата придонесуваат за јачината на струјата на сумарниот пик на кверцетин да порасне од 0,580 до 0,648 μA . Од резултатите од SWV може да се воочи дека капсаицинонот во концентрација од 20 и 50 $\mu\text{mol/L}$, го засилува антиоксидативниот ефект на кверцетинот бидејќи струјата измерена за неговиот карактеристичен нето пик е поголема од збирот на двете струи поединечно. Кога капсаицинонот беше додаден во повисока концентрација (100 $\mu\text{mol/L}$), истовремено беше засилена и електроодната реакција на капсаицинонот.

Од квадратно-брановите волтаммограми на аскорбинска киселина, капсаицин и нивни смеси, може да се види дека електрохемискиот одговор на капсаицинонот ($50 \mu\text{mol/L}$) во присуство на аскорбинската киселина ($100 \mu\text{mol/L}$) е засилен при што струјата на пикот пораснала од $0,636$ до $0,962 \mu\text{A}$, додека пик потенцијалот на аскорбинската киселина е поместен од $0,408 \text{ V}$ до $0,367 \text{ V}$. Очигледно е дека интеракцијата помеѓу витамин С и капсаицинонот се отсликува преку волтамметрискиот одговор на капсаицинонот, бидејќи електрохемискиот сигнал за овие две компоненти заедно во раствор се јавува на потенцијалот карактеристичен за капсаицин. Притоа, пикот карактеристичен за витамин С се губи.

Земајќи во предвид дека сите овие компоненти се присутни во плодот од пиперка во значителни концентрации, сметавме дека е особено важно да се испита волтамметрискиот одговор на смеша која во себе ги содржи сите четири претходно споменати компоненти во еквимоларни концентрации. Квадратно-брановиот волтаммограм на смеша од компонентите (капсаицин, витамин Е, кверцетин и аскорбинска киселина) во еквимоларни концентрации ($10 \mu\text{mol/L}$), покажува само еден нето пик на потенцијал од околу $0,128 \text{ V}$, кој се наоѓа помеѓу карактеристичниот SW пик на витамин Е и кверцетин. Овие резултати не насочуваат на тоа дека редокс комуникацијата помеѓу компонентите во смешата се оставрува и реакцијата најверојатно се одвива преку редокс реакцијата на витамин Е. Нето струјата на пикот којшто се добива со снимање на SW волтаммограм на овие четири компоненти кога се во смеша изнесува $I_{p,\text{net}} = 3,313 \mu\text{A}$.

Добиената нето струја од нето пикот на (капсаицин, витамин Е, кверцетин и аскорбинска киселина) во еквимоларни концентрации ($10 \mu\text{mol/L}$), $3,313 \mu\text{A}$ ја надминува сумата од струите добиени одделно за секој снимен волтамограм, односно за секоја компонента поединечно. Ова укажува на фактот дека овие компоненти заедно во електролитен раствор пројавуваат синергистички антиоксидациски ефект.

Со цел да се искористи волтамметрискиот одговор на смешата од овие биоактивни компоненти како референтен систем за проценка на

антиоксидативниот капацитет на екстрактите добиени од лута пиперка, беше конструирана калибрациона крива за смешата од дадените компоненти, во концентрациски опсег од 1 до 10 $\mu\text{mol/L}$. Нето струјата на SW пикови линеарно се зголемува при зголемување на концентрацијата на сите видови компоненти во смешата присутни во еквимоларни концентрации.

Репрезентативните SW волтаммограми од неколку екстракти добиени во овие резултатите покажаа дека кај екстрактите добиени од 1) везена долга, 2) феферона, 3) бомбона, 5) цинки и 6) хибридниот генотип 13515 кои содржат повисока концентрација на капсаицин (од резултатите од HPLC), нето пикот се јавува на потенцијал од околу 0,400 V кој е блиску до оксидацискиот потенцијал на капсаицинонот. Екстрактите 4) аисеф ф1, 7) пиран и 8) куртовска капија (контрола) кои содржат помали концентрации на капсаицин го пројавуваат својот SW нето пик на потенцијал околу 0,200 V, кој е блиску до оксидацискиот потенцијал на витамин Е и кверцетин. Највисокиот SW волтаметриски пик добиен од екстрактот од генотипот феферона, во споредба со смешата на стандардни раствори на четирите испитувани компоненти, покажа нето струја соодветна на стандардниот раствор кој ги содржи овие компоненти во концентрација од 6 $\mu\text{mol/L}$.

5.3.3 Резултати и дискусија на резултатите добиени од FRAP анализата

Покрај презентираниите резултати од електрохемиските анализи, вкупниот антиоксидациски капацитет (TAC, Total Antioxidative Capacity) беше одреден и со примена на FRAP спекторскопската метода.

Вкупниот антиоксидациски капацитет на стандардните раствори на капсаицин, изразен како Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$, беше спореден со вкупниот антиоксидациски капацитет на аскорбинска киселина, како позитивна контрола. Може да се воочи дека резултатите од FRAP анализата укажуваат на тоа дека антиоксидативниот капацитет на капсаицинонот е неколку пати помал во однос на антиоксидативниот капацитет на аскорбинската киселина. Ова најверојатно се должи на pH вредноста на средината во која се одвива реакцијата, бидејќи

FRAP анализата по протоколот се одвива во ацетатен пуфер со pH = 3,6. Од резултатите добиени со промена на pH на средината, односно промена на пуферот во ќелијата при циклична волтамметрија се забележува дека капсаициноот многу полесно се оксидира во базна средина (при pH = 10,6; потенцијалот за оксидација се движи околу 200 mV, додека при pH = 3,6 се оксидира на потенцијал од околу 600 mV). Воедно може да се забележи и дека антиоксидативниот потенцијал кај екстрактите добиени со Soxlet е поголем во однос на екстрактите добиени со мацерација. Ова е во согласност со резултатите добиени од HPLC анализите, каде што беше добиена повисока ефективност за екстракција на капсаицин во екстрактите добиени со Soxlet - методот.

При споредба на резултатите од спектроскопиот и електрохемискиот метод може да се забележи дека антиоксидативниот капацитет на екстрактите од различните генотипови на пиперки изразен како Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$ во FRAP анализата е во корелација со измерената јачина на струите за истите екстракти добиени со SW волтамметрија. Притоа, екстрактот од генотипот феферона со највисока концентрација на капсаицин (22,683 $\mu\text{g/mL}$), покажува највисока вредност за антиоксидативниот капацитет, 1159,893 $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ и истовремено дава пик во волтамметриските анализи со јачина на струјата од 1,802 μA . Кај одредени екстракти како кај екстрактот од везена лута и покрај ниската концентрација на капсаицин 3,791 $\mu\text{g/mL}$, сепак е забележан доста висок антиоксидациски капацитет (508,052 $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$), што одговара на јачина на струја од 0,473 μA измерени од SWV.

Истовремено, контролните примероци, екстрактите добиени од генотиповите: златен медал и куртовска капија во кои капсаициноот не може да се детектира со HPLC методата, исто така покажуваат умерен антиоксидациски капацитет (555,982 и 540,950 $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$, соодветно). Ова укажува на тоа дека антиоксидативниот капацитет на екстрактот од пиперка не зависи само од концентрацијата на капсаицин во екстрактот, туку и од другите присутни биоактивни компоненти, како и од синергистичкиот ефект помеѓу нив.

5.4 Резултати добиени од анализата на цитотоксичните особини на капсаицин и *Capsicum* екстрактите

5.4.1 Цитотоксичност на капсаицин

Цитотоксичните ефекти на капсаицин се досега доста разработени на повеќе видови на клетки од невролошко и не-невролошко потекло, при што тој пројавува најразлични карциногени ефекти (Chou et al., 2009). Според повеќе автори капсаициот поседува цитотоксични особини и може да ги инхибира клетките на панкреатичниот неуроендокрин тумор, гастричен аденокарцином, ја инхибира пролиферацијата на фибробласти и слично (Skrzypski et al., 2014; Kim et al., 2004; Yi-Ching et al., 2005).

Резултатите од оваа студија покажаа дека, капсаициот во ниски концентрации (0,5 до 10 $\mu\text{mol/L}$) не покажува сигнификантно цитотоксично дејство врз вијабилноста на неуробластома клетките. Во концентрација од 100 до 250 $\mu\text{mol/L}$ капсаициот ја инхибира вијабилноста на B104 клетките во споредба со ефектите на 0,1 % раствор на Triton X, (позитивна контрола) и DMEM (медиумот) како негативна контрола. При третман на клетките со капсаицин ($c = 100 \mu\text{mol/L}$) во времетраење од 1 час, $29 \pm 11,5\%$ од клетките беа инхибирани ($p > 0,05$). Цитотоксичниот ефект на капсаицин беше засилен при третман на клетките со истата концентрација, при подолг временски период или пак при третман со повисока концентрација. При третман на клетките со капсаицин (100 $\mu\text{mol/L}$) во период од 6 часа, $94 \pm 1\%$ од клетките беа инхибирани, додека при третман во период од 24 часа $95 \pm 0,1\%$ ($p < 0,01$). Повисоките концентрации на капсаицин (250 $\mu\text{mol/L}$), резултираат со многу повисока инхибиција на клеточната вијабилност ($93 \pm 0,5\%$, $p < 0,01$) дури и при третман на клетките од 1 час, додека при третман од 6 и 24 часа инхибицијата на клетките беше до $94 \pm 1\%$ и $95 \pm 0,2\%$, соодветно ($p < 0,01$).

Од дадените резултати беше воочено дека концентрацијата на капсаицин која е неопходна за да се инхибира 50% од клеточната вијабилност при третман на клетките во времетраење од 6 часа беше 61,9 $\mu\text{mol/L}$, додека IC_{50} за третманот од 24 часа е 61,6 $\mu\text{mol/L}$. Ефектот на капсаициот беше значително подобрен

кога периодот на третман на клетките со капсаицинон при иста концентрација (100 $\mu\text{mol/L}$) беше продолжен од 1 на 6 часа, додека продолжувањето на третманот од 6 до 24 часа не даде сигнификантно зголемување на цитотоксичниот ефект на капсаицинон. Ова го покажуваат и блиските вредности на IC_{50} добиени при третман од 6 часа и 24 часа. Richeux et al., (1999) од своите истражувања објавиле слична IC_{50} вредност ($\text{IC}_{50} = 60 \mu\text{mol/L}$) што била добиена за третман на SHSY-5Y клетките со капсаицин во времетраење од 5 дена. Ова укажува на тоа дека зголемувањето на времетраењето на третманот со капсаицин за повеќе 6 часа не може да го зголеми цитотоксичниот ефект на капсаицинон.

Капсаицинон во ниски концентрации (0,5-10 $\mu\text{mol/L}$) немаше значително влијание врз ослободувањето на LDH од клетките. Третманот на клетките со повисоки концентрации на капсаицин (100 и 250 $\mu\text{mol/L}$) резултираше со висок процент на ослободување на LDH надвор од клетките, што иницира на висок процент на смрт кај третираните клетки. Резултатите беа споредени со оние добиени од 0,1 % раствор на Triton X, (како позитивна контрола), додека како негативна контрола беше земен медиумот за култивирање на клетките DMEM. Капсаицинон (100 $\mu\text{mol/L}$) при третман од 1 час, го зголемува процентот на ослободениот LDH кај $13 \pm 6 \%$ од третираните клетки ($p > 0,05$). Притоа, слично како кај резултатите добиени од MTT тестот, цитотоксичниот ефект е засилен при зголемување на концентрацијата на капсаицинон и времетраењето на третманот. Истата концентрација на капсаицин, при третман на клетките во траење од 6 часа резултираше со $96 \pm 2,3 \%$ клеточна смрт, додека за 24 часа предизвика смртност кај $58 \pm 5,1 \%$ од клетките ($p < 0,01$). Повисоките концентрации на капсаицин (250 $\mu\text{mol/L}$) покажаа уште посилен цитотоксичен ефект дури и при третман од 1 час, процентот на смртност кај клетките изнесуваше $100 \pm 2,7 \%$, додека при третман во траење од 6 или 24 часа процентот на смртност изнесуваше $90 \pm 1,38 \%$ and $98 \pm 6,9\%$, соодветно ($p < 0,01$).

5.4.2 Ефекти на екстрактите од *Capsicum* врз вијабилноста на B104 неуробластома клетките.

Во споредба со капсаициноот, етанолните *Capsicum* екстракти не покажаа значителен ефект врз клеточната вијабилност односно врз процентот на смртност на клетките. Од резултатите од МТТ тестот, може да се види дека екстрактите од двата генотипови со висока содржина на капсаицин ($C_{\text{капсаицин}} = 74,263$ и $63,861 \mu\text{mol/L}$, кај феферона и бомбона, соодветно) и два генотипови со пониска содржина ($C_{\text{капсаицин}} = 12,413$ и $9,725 \mu\text{mol/L}$, кај везена лута и сиврија), не покажаа сигнификантна инхибиција на клеточната вијабилност. Продолжувањето на времетраењето на третманот на клетките со дадените екстракти не даде сигнификантни промени во цитотоксичниот ефект на екстрактите. Интересно е тоа што двата екстракти добиени од генотиповите феферона и бомбона со кои беа третирани клетките не покажаа цитотоксичен ефект и покрај тоа што концентрацијата на капсаицин во нив е поголема од IC_{50} ($\approx 61 \mu\text{mol/L}$). Другите два екстракти добиени од генотиповите везена лута и сиврија каде концентрацијата на капсаицин е доста мала во однос на IC_{50} , очекувано не покажаа цитотоксичен ефект врз неуробластома клетките, поради ниската концентрација на капсаицин во нив.

Резултатите од LDH тестот, ги потврдија резултатите добиени од МТТ анализите, покажувајќи дека екстрактите од овие генотипови не поседуваат цитотоксични ефекти врз неуробластома клетките. Од истражувањата на други автори, Chularojmontri et al., (2010) е потврдено дека *Capsicum* екстрактите со концентрација на капсаициноот од 0,01 до 1000 $\mu\text{g/mL}$, немале значително влијание врз преживувањето на ендотелните клетки.

Знаејќи дека екстрактот од пиперка, покрај капсаициноот, содржи и многу други биоактивни компоненти, може да се очекува дека фармаколошките ефекти на екстрактите од пиперка нема да бидат сосема исти како на изолираниот капсаицин. Аскорбинската киселина, витамин Е (Palevitch and Craker, 1995), (Daood et al., 1996), провитамин А и каротеноидите (Krinsky, 1994, 2001), (Matsufuji et al., 1998), се активни компоненти кои ги содржи плодот од пиперка и воедно поседуваат добро познати антиоксидативни особини. Присуството на флавоноидите, кверцетин и лутеолин, како и фенолните компоненти и деривати на цинамичната киселина е потврдено од Sukrasno et al., (1993). Овие хемиски компоненти кои се присутни во етанолниот екстракт од пиперка би

можеле да делуваат синергистички или антагонистички со капсаицинонот и видно да променат некои негови фармаколошки ефекти.

Поради тоа беше направена компарација на антиоксидативниот капацитет и цитотоксичните особини на екстрактите, како и на најзастапените компоненти во екстрактот (витамин Е, аскорбинска киселина, кверцетин и капсаицин) преку нивниот волтаметриски одговор. Квадратно-брановите волтамограми, добиени во присуство на капсаицин, витамин Е, аскорбинска киселина и кверцетин (во еквимоларни концентрации во ќелијата) покажаа дека овие компоненти во раствор покажуваат еден заеднички пик на потенцијал од $E_{p,net} = 0,128 \text{ V}$. Јачината на струјата на нивниот заеднички нето SW пик ($I_{p,net} = 3,313 \mu\text{A}$) добиена при овој волтаметриски експеримент го надминува збирот од струите добиени од нивните поединечни пикови, што укажува на тоа дека овие четири компоненти присутни заедно во раствор, во еквимоларни концентрации, покажуваат синергистички антиоксидациски ефект. Компонентите кои во раствор имаат антиоксидациски потенцијал реагираат како редуцирачки агенси, при што тие имаат тенденција да се оксидираат на работната електрода. Притоа, колку што е помал потенцијалот потребен за нивна оксидација, толку полесно се оксидираат (Barros et al., 2008). Од резултатите добиени од циклична волтаметрија видовме дека витаминот Е и кверцетинот ($E_{p,net} = 0,146 \text{ V}$ and $E_{p,net} = 0,108 \text{ V}$) ги пројавуваат нивните оксидациони пикови на пониски потенцијали од капсаицинонот ($E_{p,net} = 0,352 \text{ V}$). Поради ова може да кажеме дека витаминот Е и кверцетинот би можеле лесно да ги неутрализираат слободните радикали формирани под дејство на капсаицинонот на ниво на митохондријалната мембрана, при пројавување на неговиот цитотоксичен ефект.

Hu et al., (2008) покажале дека капсаицинонот преку TRPV1 рецепторот го индуцира Ca^{2+} инфлукс, при што предизвикува генерирање на реактивни кислородни радикали, деполяризација на мембраната, а со тоа и последователна клеточна смрт на синовијалните фибробласти кај стаорци. Huang et al., (2009) објавиле дека апоптотскиот процес на хепатоцелуларните канцер клетки е исто така проследен со покачување на интрацелуларните нивоа на Ca^{2+} , зголемена продукција на ROS и нарушување на мембранскиот

потенцијал на митохондриите. Овој апоптотски механизам бил потврден и кај други видови на канцер клетки.

Оттука, може да се каже дека високиот антиоксидациски капацитет на ко-екстрахираните биоактивни компоненти присутни во екстрактот од пиперка заедно со капсаицинонот, би можеле да имаат антагонистички ефект на цитотоксичното дејство на капсаицин врз неуробластома клетките.

6. ЗАКЛУЧОК

Добиените резултати од оваа студија кои се однесуваат на антиоксидативниот и цитотоксичниот капацитет на капсаицинонот покажуваат дека:

1. Екстрактите од лута пиперка кои содржат висок процент на капсаицин покажуваат значително поголем антиоксидациски капацитет од оние екстракти кои се добиени од генотиповите кои во себе содржат помал процент на капсаицин. Од генотиповите кои беа земени за анализа, може да заклучиме дека на ниво на Република Македонија, генотипот феферона содржи најголем процент на капсаицин и соодветно има најсилен антиоксидациски капацитет.
2. Волтаметриските анализи докажаа дека се јавува значителен синергистички антиоксидациски ефект на главните биоактивни компоненти на пиперката (капсаицин, витамин Е, витамин С, кверцетин) кога се испитувани заедно во раствор со физиолошка рН вредност. Оваа студија предлага нов, брз и едноставен директен волтаметриски метод за одредување на антиоксидативниот капацитет на растителни екстракти не само од пиперка туку и други лековити растенија кои претставуваат комплексна смеса од најразлични биоактивни компоненти.
3. Од добиените резултати за цитотоксичност на капсаицинонот врз неуробластома клетките може да се заклучи дека капсаицинонот поседува цитотоксичен ефект само во повисоки концентрации (100 и 250 $\mu\text{mol/L}$), додека пониските концентрации на капсаицин (0,5-10 $\mu\text{mol/L}$), не покажаа сигнификантен цитотоксичен ефект врз неуробластома клетките. Ова докажува дека цитотоксичниот ефект на капсаицинонот врз В104 неуробластома клетките е зависен од дозата што ќе се примени при нивниот третман. Воедно, беше потврдено дека пролонгирањето на третманот на клетките со капсаицин од 6 до 24 часа нема големо влијание врз цитотоксичниот ефект на капсаицинонот.

4. Резултатите од MTT и LDH тестовите, кои се однесуваат на цитотоксичните особини на екстрактите добиени од различни генотипови на пиперки покажаа дека екстрактите немаат цитотоксично дејство врз неуробластома клетките.
5. Антиоксидативниот ефект на комплексниот состав на екстрактот од плодот од лутата пиперка би можел да биде одговорен за тоа што етанолните екстракти кои содржат доволно високи концентрации на капсаицин не покажуваат цитотоксични ефекти.
6. Синергистичкиот антиоксидациски ефект на капсаицино со витамин Е, аскорбинска киселина и кверцетин, ни дава за право да кажеме дека лутата пиперка може да се користи како силен антиоксиданс од раститлено потекло во превенција на многу хронични заболувања.
7. Податоците од овие истражувања даваат основа и за инкорпорирање на капсаицино во различни видови на хербални препарати кои би имале силен антиоксидациски капацитет.
8. Докажавме дека изолираниот капсаицин може да се користи како цитотоксичен агенс, поради што постојат основи за понатамошни испитувања во однос на капсаицино и неговата употреба во терапија на рак.
9. Резултатите од оваа студија ни даваат за право да кажеме дека производството и употребата на лутата пиперка во Република Македонија, како една од најпознатите агрономски култури, треба да се стимулира поради можностите за нејзината широка примена, како во исхраната така и во фармацевтски цели.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas M., Ferreira, I., (2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.*, 111, 61-66
- Benzie, F. F. and Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 1996, 239 (292), 70-76.

- Caterina, M.J., Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review Neuroscience*, 24, 487-517.
- Chou, C.C., Wu, Y.C., Wang, Y.F., Chou, M.J., Kuo, S.J., Chen, D.R. (2009). Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. *Oncology Reports*, 21(3), 665-71.
- Chularojmontri, L., Suwatronnakorn, M., Wattanapitayakul, K. S., (2010). Influence of Capsicum extract and capsaicin on endothelial health. *J Med Assoc Thai*. 93 (2), 92-100.
- Collins, M.D., Wasmund, L. M., Bosland, P. W, (1995). Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using high-performance liquid chromatography. *Hort Science*. 30(1), 137–139.
- Daood, H. G., Vinkler, M., Markus, F., Hebshi, E. A., Biacs, P.A. 1996. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chem*. 55, 365-372.
- Goci, E., Haloci, E., Vide, K., Malaj, L., 2013. Application and comparison of three different extraction methods of capsaicin from Capsicum annum. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences* 1 (1), 16-19.
- Henderson, D. E.; Slickman, A. M.; Henderson, S. K. (1999). Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. *J. Agric. Food Chem*. 47, 2563-2570
- Hu, F., Sun, W.W., Zhao, X.T., Cui, Z. J., Yang, W.X., (2008). TRPV1 mediates cell death in rat synovial fibroblasts through calcium entry-dependent ROS production and mitochondrial depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 369 (4), 989-993.
- Huang, S.P., Chen, J.C., Wu, C.C., Chen, C.T., Tang, N.Y., Ho, Y.T., Lo, C., Lin, J.P., Chung, J.G., & Lin, J.G. (2009). Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Research*, 29(1), 165-74.
- Iwai, K., Yazawa, A., Watanabe, T. (2003). Roles as metabolic regulators of the non-nutrients, capsaicin and capsiate, supplemented to diets. *Proceedings of the Japan Academy*, 79, 207–212.
- Јанкуловски, Д. (1997). Пиперка и патлиџан. Земјоделски факултет. Скопје.
- Kachoosangi, R.T., Wildgoose E.G., Compton, R.G. (2008). Carbon nanotube-based electrochemical sensors for quantifying the 'heat' of chilli peppers: the adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin. *Analyst*, 133, (7), 888-895.

- Kim, S.R., Kim, S.U., Oh, U., Jin, B.K. (2006). Transient receptor potential vanilloid subtype 1, mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca^{2+} mitochondrial damage and cytochrome C release, *Journal of Immunology*, 177, 4322-4329.
- Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., Watanabe, T. (1998) Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 1695–1697.
- Krinsky, N.I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17(10), 815-817.
- Krinsky, N.I., (1994). The biological properties of carotenoids. *Pure Appl.Chem.* 66, 1003-1010.
- Колева Гудева, Л., Андрогенеза и органогенеза на пиперка (*Capsicum annuum* L.), сорти Куртовска капија и Златен медал, докторска дисертација, Скопје, 2003. УКИМ, ПМФ.
- Ludy, M.J., Moore, G.E., Mattes R.D. (2012). The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chemical senses*, 37(2), 103–121.
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M., Takeda, M., (1998). Antioxidant activity of capsantin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46, 3468-3472.
- Othman, Z.A., Hadj Ahmed, Y.B., Habila, M.A., Ghafar A.A. (2011). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*, 16, 8919-8929.
- Palevitch, D., Craker, L.E., (1995). Nutritional and medicinal importance of red pepper (*Capsicum* spp.). *J. Herbs Spices Med. Plants.* 3, 55-83.
- Perucka, I., Oleszek, W., (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 71, 287-291.
- Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kines, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W., Brandt, B.L. (1974). Clonal cell lines from rat central nervous system. *Nature* 249, 224-227.
- Stahl, W, Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med.* 24(6), 345-351.
- Sukrasno, N., Yeoman, M. M., (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry.* 32, 839-844.

Wagner, E.C., Cahill, M.T., Marshall, A.P., (2011). Extraction, purification, and spectroscopic characterization of a mixture of capsaicinoids. J. Chem. Educ. 88, 1574–1579.

Yardim Y., Senturk Z., (2013). Electrochemical evaluation and adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin or dihydrocapsaicin on a disposable pencil graphite electrode, Talanta. 112, 11-19.